



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0815258-6 A2



(22) Data do Depósito: 22/08/2008

(43) Data da Publicação Nacional: 05/03/2009

(54) Título: MÉTODO E DISPOSITIVO PARA TRANSMITIR DE FORMA CONFIÁVEL, BLOCOS DE RÁDIO APROVEITANDO-SE DOS CAMPOS ACK/NACK.

(51) Int. Cl.: H04L 1/16; H04L 27/34.

(30) Prioridade Unionista: 24/08/2007 US 60/957,908.

(71) Depositante(es): INTERDIGITAL PATENT HOLDINGS, INC..

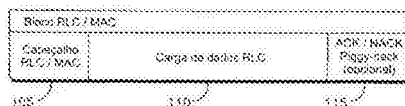
(72) Inventor(es): BEHROUZ AGHILI; MARIAN RUDOLF; PRABHAKAR R. CHITRAPU; STEPHEN G. DICK.

(86) Pedido PCT: PCT US2008073985 de 22/08/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/029511 de 05/03/2009

(85) Data da Fase Nacional: 24/02/2010

(57) Resumo: CAPACITOR ELETROLÍTICO DE ALUMÍNIO A presente invenção fornece um capacitor eletrolítico de alumínio contendo um cátodo, um ânodo e um espaçador melhorado composto de nanofibras poliméricas. O espaçador de nanofibra oferece baixa resistência iônica, propriedade de barreira desejável e alta absorção de eletrólito. O uso dos espaçadores melhorados resultou em dispositivos com maior capacitância, menor ESR, menor geração de calor e melhorou a eficiência de fabricação dos capacitores.



"MÉTODO PARA MELHORAR A RECUPERAÇÃO DO PETRÓLEO"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere ao campo da microbiologia ambiental e a modificação das propriedades do petróleo bruto pesado utilizando microorganismos. Mais especificamente, os microorganismos desnitrificantes anaeróbios puros são identificados e aplicados para modificar as propriedades do petróleo bruto pesado.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O desafio para atender a demanda crescente por petróleo inclui o aumento da recuperação do petróleo bruto a partir de reservatórios de petróleo pesado. Este desafio resultou na expansão de esforços para desenvolver processos de recuperação de petróleo alternativos custo-eficiente (Kianipey, S. A. e Donaldson, E. C. 61º Annual Technical Conference and Exhibition, New Orleans, LA, E.U.A., 5 a 8 de outubro de 1986). Os hidrocarbonetos pesados na forma de depósitos de petróleo em reservatórios de petróleo estão distribuídos mundialmente. Estas reservas de petróleo são medidas em centenas de bilhões de barris recuperáveis. Pelo fato do petróleo bruto pesado possuir uma viscosidade relativamente alta, ele é essencialmente imóvel e não pode ser facilmente recuperados pelos meios convencionais primário e secundário.

MEOR (*Microbial Enhanced Oil Recovery*) é uma metodologia para aumentar a recuperação de petróleo pela ação de microorganismos (Brown, L. R., Vadie, A. A., Stephen, O. J. SPE 59306, SPE/DOE Improved Oil Recovery Symposium, Oklahoma, 3 a 5 de Abril de 2000). A pesquisa e o desenvolvimento Meor é um esforço em curso direcionado às técnicas em desenvolvimento para a utilização de microorganismos para modificar as propriedades do petróleo bruto para beneficiar a recuperação do petróleo (Sunde, E., Beeder, J., Nilsen, R. K. Torsvik, T., SPE 24204, SPE/DOE 8º

Symposium on enhanced Oil Recovery, Tulsa, OK, E.U.A., 22 a 24 de abril de 1992).

Os métodos para a identificação de microorganismos úteis nos processos Meor foram descritos. Estes métodos exigem a identificação de amostras retiradas de um poço de petróleo ou reservatório compreendendo um consórcio de microorganismos e enriquecimento ou evolução das populações na amostra, em condições específicas com meios nutrientes definidos. Vide, o pedido de patente US 10/564365.

A degradação microbiana dos hidrocarbonetos também foi descrita, em condições aeróbia ou mista (aeróbia e anaeróbia), como um mecanismo para a redução da viscosidade do petróleo. A degradação nestas circunstâncias exige microorganismos desenvolvidos e nutrientes específicos que não mostraram ser um meio econômico para melhorar a recuperação do petróleo (vide a patente US 5.492.828).

Assim, há uma necessidade em desenvolver métodos para: (1) identificar os microorganismos que poderiam ser utilizados para aumentar a recuperação do petróleo em condições econômicas; (2) identificar os microorganismos que podem crescer no petróleo em condições anaeróbias, sem a necessidade de suplementação de nutrientes ou enriquecimento em longo prazo de microorganismos autóctones; e (3) utilização de ditos microorganismos identificados, de forma custo-eficiente, para melhorar a recuperação do petróleo.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

Os métodos descritos no presente atendem às necessidades identificadas acima, descrevendo os métodos de identificação de gêneros bacterianos autóctones e utilizando técnicas de identificação filogenética baseada na filogenia dos gêneros autóctones para selecionar culturas bacterianas anaeróbias puras que respiram pela desnitrificação e que são

capazes de crescer no petróleo sem suplementação de nutrientes complexos.

Além disso, os métodos são descritos para a utilização de ditas culturas puras, sem enriquecimento ou desenvolvimento dirigido, para melhorar economicamente a recuperação do petróleo. Estas culturas puras são utilizadas para aumentar a recuperação do petróleo em uma ou mais das seguintes formas: (1) alteram a permeabilidade da formação subterrânea para melhorar a eficiência da varredura por água; (2) produzem biotensoativos que diminuem as tensões de superfície e interfaciais; (3) mediam mudanças na molhabilidade; (4) produzem polímeros que facilitam a mobilidade do petróleo; e (5) geram gases (principalmente o CO_2) que aumentam a pressão de formação e reduzem a viscosidade do petróleo.

Especificamente, a presente invenção se refere à aplicação de uma bactéria da tipagem filogenética de rDNA encontrada em amostras ambientais obtidas a partir de um poço ou reservatório de petróleo, seguido pela identificação e obtenção de culturas puras de espécies de bactérias conhecidas com constituição genética similar, então selecionar estas linhagens para funcionalidades relevantes, tal como a capacidade de crescer em petróleo bruto sob condições desnitrificantes.

Em uma realização, a presente invenção descreve um método para melhorar a recuperação do petróleo a partir de um poço de petróleo, que compreende:

(a) fornecer uma amostra do ambiente que compreende as populações microbianas autóctones em ditas amostras ambientais;

(b) identificar o gênero microbiano presente em dita amostra ambiental pela tipagem filogenética;

(c) selecionar uma ou mais espécies de cultura pura conhecidas do gênero identificado em (b), em que ditas espécies são capazes de crescer no petróleo; e

(d) identificar as funcionalidades relevantes das espécies (c) para a utilização na melhoria da recuperação do petróleo.

Em um aspecto, a presente invenção determina que a melhor recuperação do petróleo ocorre através da redução da viscosidade do petróleo bruto pelo crescimento de uma espécie em (c) possuindo certas funcionalidades identificadas na etapa (d) em um reservatório de petróleo, em que dito crescimento resulta na produção de qualquer um dos biotensoativos, dióxido de carbono ou massa celular, e na degradação seletiva dos componentes de alto peso molecular no poço de petróleo ou suas combinações.

Em outra realização, a melhor recuperação de petróleo é aprimorada pelo crescimento de uma espécie de (c) que possui certas funcionalidades identificadas na etapa (d), em um poço de petróleo, em condições anaeróbias e desnitrificantes, substancialmente sem corrosão da maquinaria de recuperação e processamento.

Em outra realização, o mapeamento filogenético é utilizado para prever os nutrientes necessários para estimular seletivamente o crescimento de determinadas espécies em detrimento de outras.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A presente invenção pode ser melhor compreendida a partir da seguinte descrição detalhada, Figura 1, e das descrições de seqüência anexas, que fazem parte do presente relatório descritivo.

Figura 1 - Representa as concentrações de nitrato e nitrito (ppm) após 36 dias de crescimento no petróleo bruto. O nitrato e nitrito foram medidos utilizando a cromatografia de troca iônica.

As seguintes seqüências estão em conformidade com a norma 37 C.F.R. 1.821 – 1.825 (*Requirements for Patent Applications Containing Nucleotide Sequences and/or Amino Acid Sequence Disclosures - the*

Sequence Rules) e são consistentes com o padrão ST.25 (1998) do *World Intellectual Property Organization* (WIPO) e os requisitos da listagem da sequência do EPO e PCT (Regras 5.2 e 49.5 (a-bis), e na Seção 208 e no Anexo C das instruções administrativas. Os símbolos e formato utilizado para os dados da sequência de nucleotídeos e aminoácidos cumprem as regras estabelecidas na norma 37 C.F.R. § 1,822.

SEQ ID NO: 1 - 8F Início (forward)
AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3'

SEQ ID NO: 2 - 1407R primer reverso 1407R-
10 GACGGGGGTGWGTRCAA-3'

A SEQ ID NO: 1 e a SEQ ID NO: 2 foram utilizadas para a amplificação dos genes de rDNA bacterianos.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere aos métodos para a identificação de microorganismos úteis para melhorar a recuperação do petróleo. Especificamente os métodos descritos no presente estão direcionados à geração de um mapa filogenético de microorganismos a partir de um poço de petróleo e a utilização de dito mapa filogenético para identificar as culturas puras relacionadas úteis para melhorar a recuperação do petróleo, ou seja, as culturas que respiram por desnitrificação e são capazes de crescer no petróleo sem a suplementação de nutrientes complexos.

Além disso, os métodos são descritos para a utilização de ditas culturas puras identificadas, sem o enriquecimento ou o desenvolvimento direcionado, para melhorar economicamente a recuperação do petróleo.

25 As culturas puras identificadas pelas metodologias reivindicadas são utilizadas para aumentar a recuperação do petróleo em uma ou mais das seguintes formas: (1) alterar a permeabilidade da formação subterrânea para melhorar a eficiência da varredura por água; (2) produzir biotensoativos que

diminuem as tensões de superfície e interfaciais; (3) mediar mudanças na molhabilidade; (4) produzir polímeros que facilitam a mobilidade do petróleo; e (5) gerar gases (principalmente o CO_2) que aumentam a pressão de formação e reduzem a viscosidade do petróleo; todos os quais beneficiam a recuperação e/ou o processamento do petróleo bruto pesado.

As seguintes definições são fornecidas através de termos especiais e abreviaturas utilizadas no presente pedido:

A abreviatura "PCR" se refere à reação em cadeia da polimerase.

A abreviatura "SDS" se refere ao dodecil sulfato de sódio.

A abreviatura "dNTPs" se refere ao desoxiribonucleotídeo trifosfato.

A abreviatura "ATCC" refere-se à American Type Culture Collection International Depository, Manassas, VA, E.U.A.. A abreviatura "ATCC No." se refere ao número de acesso às culturas no depósito com ATCC.

O termo "Sarcosil" é o detergente aniônico, ácido *N*-metilaminoacético.

A abreviatura "ASTM" se refere à American Society for Testing and Materials.

O termo "amostra ambiental" significa qualquer amostra exposta aos hidrocarbonetos, incluindo uma mistura de água e óleo. Conforme utilizado no presente, as amostras ambientais incluem as amostras de água e óleo, que compreendem os microrganismos autóctones úteis no mapeamento filogenético dos gêneros presentes em uma determinada área de amostragem.

Os termos "poço de petróleo" e "reservatório de óleo" podem ser utilizados no presente indistintamente e se referem à formação subterrânea ou em leito marinho a partir do qual o petróleo que pode ser recuperado.

O termo "consórcio microbiano" significa uma mistura de microrganismos de diferentes espécies presente como uma comunidade que

fornece um efeito sinérgico para aumentar a recuperação do petróleo.

O termo "populações microbianas" significa uma ou mais populações de microrganismos presentes tanto nas amostras obtidas a partir dos poços de petróleo como em um inóculo para injeção em um poço de petróleo.

O termo "cresce no petróleo" significa que as espécies microbianas são capazes de metabolizar os hidrocarbonetos ou outros compostos orgânicos do petróleo bruto como um nutriente para sustentar o crescimento.

Os termos "desnitrificantes" e "desnitrificação" significam a redução do nitrato para o uso na geração de energia respiratória.

O termo "eficiência de varredura" significa a capacidade da água injetada em 'empurrar' o petróleo através de uma formação geológica em direção a um poço produtor.

O termo "cultura pura" significa uma cultura derivada de uma única célula isolada de uma espécie microbiana. As culturas puras especificamente referidas no presente incluem aquelas que estão publicamente disponíveis em um depósito. As culturas puras adicionais são identificáveis pelos métodos descritos no presente relatório descritivo.

O termo "funcionalidades relevantes" significa a capacidade de reduzir nitritos e nitratos e crescer em condições anaeróbias; a capacidade de utilizar pelo menos um componente disponível no poço de petróleo como fonte de carbono; a capacidade de utilizar pelo menos um componente na água de injeção ou de produção; a capacidade de atingir uma taxa de crescimento desejada na presença do petróleo; e a capacidade de crescer de forma ótima em um ambiente do poço de petróleo; e suas combinações.

O termo "biofilme" significa uma película ou "camada de biomassa" de microorganismos. Os biofilmes são muitas vezes incorporados

em polímeros extracelulares, que se aderem às superfícies submersas em ambientes aquáticos, ou submetidas ao mesmo.

O termo "nitratos simples" e "nitritos simples" se referem ao nitrito (NO_2) e ao nitrato (NO_3).

5 O termo "corrosão oxidativa" se refere à conversão química de um metal para um produto inferior, que ocorre na presença de ar (por exemplo, o oxigênio).

O termo "microorganismos piezófilicos" significa os micróbios que crescem otimamente em alta pressão, por exemplo, os micróbios que não
10 podem crescer a menos de 50 MPa (500 vezes a pressão atmosférica) de pressão, e crescem otimamente a 80 MPa (800 vezes a pressão atmosférica).

O termo "microorganismos acidófilicos" significam os micróbios que crescem otimamente em condições ácidas – possuindo um crescimento ótimo de pH abaixo de 6,0 e, por vezes tão baixo quanto o pH 1,0.

15 O termo "microorganismos alcalófilicos" significa os micróbios que crescem otimamente em condições alcalinas - tipicamente exibindo um ou mais crescimento ótimo dentro do intervalo de pH 8 a 11 e que normalmente crescem lentamente ou não no pH 7,0 ou abaixo deste.

O termo "microorganismos halófilicos" significam os micróbios que
20 crescem de forma ótima na presença de eletrólito (geralmente NaCl) em concentrações acima de 0,2 M e que tipicamente crescem pouco ou nada em baixas concentrações de eletrólitos.

O termo "microorganismos psicrófilos" significa os microorganismos que crescem otimamente a uma temperatura de 20° C ou
25 abaixo.

O termo "modificando o ambiente do poço de petróleo" inclui (1) altera a permeabilidade da formação subterrânea (eficiência de varredura), (2) produz biotensioativos que diminuem as tensões de superfície e interfaciais, (3)

media mudanças na molhabilidade, (4) produz polímeros que facilitam a mobilidade do petróleo; e (5) gera gases (principalmente o CO₂) que aumentam a pressão de formação; e (6) reduzem a viscosidade do petróleo.

O termo "inoculação de um poço de petróleo" significa injetar uma ou mais populações de microorganismos em um poço de petróleo ou reservatório de petróleo de tal forma que os microorganismos são fornecidos ao poço ou reservatório sem perda da viabilidade total.

Os termos "tipagem filogenética", "mapeamento filogenético" ou "classificação filogenética" podem ser utilizados intercambiavelmente no presente e se referem a uma forma de classificação na qual os microorganismos são agrupados de acordo com sua linhagem ancestral. Os métodos mencionados são especificamente direcionados para a tipagem filogenética de amostras ambientais com base no seqüenciamento do DNA ribossomal 16S (rDNA). Neste contexto, um comprimento total do par de base de 1.400 (pb) da seqüência do gene 16S rDNA é gerado utilizando os *primers* identificados no presente e comparados por homologia a uma base de dados de seqüências de rDNA conhecida de microorganismos conhecidos. Esta comparação é então utilizada para a identificação de culturas puras para o uso na recuperação aprimorada do petróleo.

Os termos "fontes de carbono adicionais" ou "nutrientes carbono complexos" podem ser utilizados intercambiavelmente no presente e se referem a adição de fontes de carbono na circunstância em que um microorganismo é incapaz de crescer no petróleo sem o carbono adicional acrescentado.

O termo "suplementação de nutrientes" se refere à adição de nutrientes que beneficiam o crescimento de microorganismos que são capazes de utilizar o petróleo como a sua principal fonte de carbono, mas crescer de forma otimizada com outros aditivos, tais como as fontes de carbono (com

exceção dos hidrocarbonetos), tais como o extrato de levedura, peptona, succinato, lactato, formiato, acetato, propionato, glutamato, glicina, lisina, citrato, glicose e soluções de vitamina.

O termo "espécies microbianas" significa microrganismos distintos
5 identificados com base em sua fisiologia, morfologia e características filogenéticas utilizando as seqüências de 16S rDNA.

A abreviatura "NCBI" se refere ao National Center for Biotechnology Information.

A abreviatura "rDNA" se refere ao ácido desoxirribonucleico
10 ribossomal.

A abreviatura "cDNA" se refere a uma fita dupla de DNA que é complementar ao RNA mensageiro e derivada do meso.

O termo "Archaeal" significa que pertence ao Archaea – Archaea são um reino de espécies microbianas separadas dos outros procariotos, com
15 base em sua fisiologia, morfologia e homologias na seqüência do 16S rDNA.

O termo "filogenético" se refere ao estudo do parentesco evolutivo entre os diferentes grupos de organismos (por exemplo, espécies, populações).

O termo "tipo de rDNA" significa o processo de utilização da seqüência do gene que codifica o 16S rDNA para obter as espécies
20 microbianas "mais familiares" por homologia com as seqüências de rDNA mantida em várias bases de dados internacionais.

O termo "complementar" é utilizado para descrever a relação entre as bases de nucleotídeos que são capazes de hibridização entre si. Por exemplo, com relação ao DNA, a adenosina é complementar à citosina e a
25 timina é complementar à guanina.

O termo "identidade porcentual", como é conhecido no estado da técnica, é uma relação entre duas ou mais seqüências polipeptídicas ou duas ou mais seqüências de nucleótidos, conforme determinado pela comparação

das seqüências. No estado da técnica, a "identidade" também significa o grau de parentesco das seqüências entre as seqüências de polinucleotídeo, conforme determinado pela correspondência entre as fitas de tais seqüências. "Identidade" e "semelhança" pode ser facilmente calculadas através de métodos conhecidos incluindo, mas não limitados, aos descritos em *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed. Oxford University Press, NY, 1988; e *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, NY, 1993; e *Computer Analysis of Sequence Data*, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, NJ, 1994; e *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., ed., Academic Press, 1987; e *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., Stockton Press, NY, 1991. Os métodos preferidos para determinar a identidade se destinam a fornecer a melhor correspondência entre as seqüências testadas. Os métodos para determinar a identidade e a similaridade são codificados nos programas de computador disponíveis publicamente.

O termo "software de análise da seqüência" se refere a qualquer algoritmo de computador ou programa de software que seja útil para a análise dos nucleotídeos ou seqüências de aminoácidos. O "software de análise da seqüência" pode estar comercialmente disponível ou ser desenvolvido de forma independente. O software de análise sequencial típica irá incluir, mas não está limitado a: o conjunto GCG de programas (Wisconsin Package versão 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI), BLASTP, BLASTN, BLASTX (Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 215, 403 a 410, 1990), DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, WI), e o programa FASTA incorporando o algoritmo de Smith-Waterman (Pearson, W. R., *Comput. Methods Genome Res.*, [Proc. Int. Symp. Meeting Date 1992, 111 – 120. eds: Suhai, Sandor. Editor: Plenum, New York, NY, 1994). Dentro do contexto do presente pedido, será entendido que, quando o software de análise da seqüência for utilizado para a análise, os resultados

das análises serão baseados nos "valores default" do programa citado, salvo indicação em contrário. Conforme utilizado no presente "valores default" significará qualquer conjunto de valores ou parâmetros que carregar originalmente com o software quando inicializado pela primeira vez.

5 As abreviaturas adicionais utilizadas no presente relatório descritivo são as seguintes: "h" significa hora(s), "min" significa minuto(s), "dia" significa dia(s), "mL" significa mililitros, "mg/mL" significa miligrama por mililitro, "L" significa litros, "µL" significa microlitros, "mm" significa milimolar, "µM" significa micromolar, "pmol" significa picomol(s), "°C" significa graus centígrados ou Celsius, "RT" significa temperatura ambiente, "bp" significa par de base, "bps" significa pares de bases, "kDa" significa kilodaltons. "EtOH" significa etanol, "µg/L" significa microgramas por litro, "v/v/v", volume por volume por volume, "%" significa por cento, "nM" significa nano molar, "w/w" peso por peso, "ppm" significa parte por milhão.

15 TIPAGEM FILOGENÉTICA

Os métodos para a geração de sondas de oligonucleotídeos e microarranjo para a realização de análises filogenéticas são conhecidos pelos técnicos no assunto (Loy, A., et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 6998-700, 2004) e (Loy A. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 5064-5081, 2002) e 20 (Liebich, J., et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 1688-1691, 2006). Estes métodos são aplicados no presente com a finalidade de identificar os microrganismos presentes em uma amostra ambiental.

Especificamente, as seqüências conservadas da região codificadora 16S ribossomal RNA do DNA genômico são utilizadas no presente, 25 no entanto, existem outras metodologias úteis para a tipagem filogenética observadas na literatura. Estes incluem: 23S rDNA ou genes A girase e/ou outras seqüências de gene altamente conservadas. O 16S rDNA é comumente utilizado porque a base de dados comparativa de espécies conhecidas é a

maior até à data.

Os *primers* descritos no presente foram escolhidos como relevantes para as amostras ambientais a partir de um reservatório de petróleo (Grabowski, A., et al., FEMS Micro Eco, 544, 427-443, 2005) e por
 5 comparações com outros conjuntos de *primers* utilizados para outros estudos ambientais. Uma revisão dos *primers* disponíveis para uso no presente pode ser encontrada em Baker et al., (GC Baker, GC et al., *Review and re-analysis of domain-specific primers*, J. Microbiol. Meth., 55, 541-555, 2003). Quaisquer
primers que geram uma parte ou toda a sequência do 16S rDNA seria
 10 adequado para o método reivindicado.

A extração de DNA pela técnica com fenol/ clorofórmio é conhecida no estado da técnica e utilizado no presente como adequado para a extração de DNA a partir das amostras ambientais contaminadas com petróleo. No entanto, existem outras metodologias para extração de DNA na literatura
 15 que podem ser utilizadas em conformidade com a presente invenção.

As metodologias de sequenciamento de DNA que geram >700 bases de sequências de alta qualidade podem ser utilizadas para o tipo de sequenciamento com base no plasmídeo de acordo com a presente invenção, em conjunto com uma sequência de programas de análise de qualidade. As
 20 comparações por homologia utilizando os algoritmos BLAST para qualquer banco de dados abrangente de 16S rDNAs conseguiriam um resultado aceitável para a identificação dos gêneros de microrganismos presentes na amostra ambiental. As bases de dados mais utilizadas são a ARB (Ludwig, W., et al., *ARB: a software environment for sequence data*. Nucleic Acids Res., 32,
 25 1363-1371, 2004) e NCBI.

AMOSTRAGEM DO POÇO DE PETRÓLEO PARA ESTUDOS FILOGENÉTICOS

As amostras utilizadas para este estudo foram obtidas conforme descritas no Exemplo 1. O DNA foi extraído de ditas amostras seguido pela

tipagem filogenética. As amostras ambientais para a tipagem ou mapeamento filogenético poderiam provir de qualquer água associada a um sistema de reservatório de petróleo, incluindo a água da tubulação e canos no poço de produção, os poços de injeção de água, os núcleos obtidos diretamente a partir da formação geológica com as águas subterrâneas associadas ou quaisquer outras fontes de água associadas. As amostras podem ser obtidas a partir de qualquer sistema de reservatório de petróleo. As amostras descritas no presente incluem as amostras ambientais a partir dos reservatórios de petróleo pesado no North Slope do Alasca, mas também poderia incluir reservatórios de petróleo pesado mesófilos semelhante na Rússia ou no Canadá ou quaisquer reservatórios de petróleo pesado termofílico na América do Sul, Mar do Norte, África, Mar do Golfo de qualquer outra localização de qualquer reservatório de petróleo possuindo qualquer temperatura ou perfil de viscosidade em todo o mundo.

SELEÇÃO DE CULTURAS PURAS

A seleção de culturas puras para a utilização neste estudo foi baseada nos gêneros descobertos no sistema de produção do reservatório do North Slope do Alasca. Os gêneros identificados a partir de amostras ambientais foram mapeados por filogenia e utilizados para selecionar culturas puras para uso na melhoria da recuperação do petróleo. As espécies de cultura pura descritas a seguir foram escolhidas para uma análise com base no mapeamento filogenético conforme relacionado aos gêneros identificados nas amostras ambientais. A análise de ditas culturas resultou na identificação de culturas com a capacidade de respirar por desnitrificação e crescer no petróleo sem a adição de nutrientes de carbono complexos, bem como exibindo uma ou mais funcionalidades relevantes para o beneficiamento da recuperação de petróleo.

As culturas identificadas e utilizadas no presente estão disponíveis

pela American Type Culture Collection. Há muitas coleções de cultura pública global, tal como a coleção de cultura DMS baseada na Alemanha ou a coleção USDA NRRL e a National collection of Industrial Bacteria (NCIB) na Inglaterra. Qualquer coleção de cultura publicamente disponível poderia ser utilizada para este tipo de
 5 seleção se ela contiver as espécies do género correto.

As culturas úteis para a seleção baseadas no parentesco das amostras ambientais também podem ser seleccionadas para a análise das funcionalidades relevantes com base nas referências bibliográficas e na associação com o petróleo ou com os componentes do petróleo.

10 PROPRIEDADES DO GÉNERO OBSERVADO NO SISTEMA DE RESERVATÓRIO DE PETRÓLEO

O processo clássico de enriquecimento dos isolados de microrganismos ambientais sobre um substrato de interesse, ou seja, o petróleo bruto, na cultura anaeróbia, requer amplos períodos de crescimento e
 15 múltiplas transferências sequenciais. Ao utilizar a informação obtida a partir da análise filogenética do poço de petróleo alvo descrito acima, esta abordagem laboriosa pode ser contornada. A literatura pode ser citada para restringir a seleção de espécies dos géneros identificados como sendo parte da população nativa do sistema de água do reservatório de petróleo, ou as espécies podem
 20 ser seleccionadas de forma aleatória, ou quanto à sua disponibilidade como uma cultura pura. Esses microorganismos, que são identificáveis como culturas puras nas propriedades do ATCC ou algum outro depósito, podem ser adquiridos e analisados quanto às funcionalidades relevantes, incluindo a capacidade de degradar o petróleo bruto nas condições de interesse.

25 Em um aspecto dos métodos descritos no presente, diversas culturas bacterianas puras conhecidas foram seleccionadas com base em suas semelhanças filogenéticas com as espécies nativas microbianas associadas. Pode ser feita uma consideração com relação às culturas puras conhecidas

identificadas como sendo isoladas de um ambiente de hidrocarbonetos ou outros locais pertinentes, ou alegadamente possuindo alguma capacidade de afetar os hidrocarbonetos.

TABELA 1

**LISTA DE CEPAS OBTIDAS A PARTIR DO ATCC E TESTADAS QUANTO AO
CRESCIMENTO EM PETRÓLEO OU NOS COMPONENTES DO PETRÓLEO**

Microorganismo	ATCC#	Capacidades metabólicas explicadas
<i>Comamonas terrigena</i>	14635	Decompõe o fenol e o <i>m</i> -cresol
<i>Fusibacter paucivorans</i>	700852	Reduz o tiosulfato do poço de produção do petróleo, encontrado na amostra de água de produção do poço de petróleo
<i>Marinobacterium georgiense</i>	33635	Encontrado na amostra de água de produção do poço de petróleo
<i>Petrotoga miotherma</i>	51224	Da água salgada do reservatório de petróleo, encontrado na amostra de água de produção do poço de petróleo
<i>Shewanella putrefaciens</i>	51753	De Oleodutos da Alberta Canadá, tetraclorometano desalogenado, encontrado na amostra de água de produção do poço de petróleo
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	BAA-172	Cepa OX1, degrada o tolueno/ xileno aerobicamente, isolados do lodo
<i>Vibrio alginolyticus</i>	14582	Creosoto tolerante
<i>Thauera aromática S100</i>	700265	Isolado do solo contaminado por petróleo CA, degrada o tolueno, fenol
<i>Thauera aromática T1</i>		Tolueno, degradação do fenol

As culturas puras conhecidas, uma vez identificadas como pertencentes a gêneros relevantes para um reservatório de petróleo (conforme determinado pela tipagem filogenética), podem ser testadas quanto às funcionalidades relevantes pelos testes de diagnóstico convencionais, tais como o crescimento em meios seletivos para desnitrificantes, fermentadores, 5 redutores de sulfato, metanógenos, acetogênicos e outros fenótipos fisiológicos.

No Exemplo 5, as cepas ATCC que crescem dentro ou sobre o petróleo bruto em condições anaeróbias desnitrificantes foram identificadas.

10 Conforme descrito no Exemplo 5, todas as cepas exceto o *Clostridium amygdalium* cresceram em condições desnitrificantes utilizando o petróleo como única fonte de carbono. O *Marinobacterium georgiense* não era previamente conhecido por crescer de forma anaeróbia em condições desnitrificantes na presença de óleo. O *Comamonas terrigena*, uma bactéria do solo, (originalmente apresentada como uma espécie *Vibrio*) era um 15 desnitrificante facultativo conhecido, mas não tinha sido relatado pelo fato de crescer sobre os componentes do petróleo. Embora as espécies *Comamonas* sejam conhecidas para degradar o fenol em condições aeróbias (Watanabe, et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 1203-1209, 1998), a sua capacidade de crescer no petróleo em condições anaeróbias não havia sido relatada 20 previamente. A *Petrotoga miotherma*, uma bactéria termofílico e anaeróbia estrita conhecida, era conhecida por reduzir o sulfato e o tiosulfato na presença de petróleo em temperaturas de moderadas a altas (Davey, M. E., *Syst. Appl. Microbiol.*, 16, 191 - 200, 1993) e, (Lien, T., et al., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48, 1007-1013, 1998). No entanto, este organismo não era 25 conhecido por utilizar o nitrato como um aceptor de elétrons.

A *Thauera aromatica* T1 cresce em tolueno e fenol em condições desnitrificantes (Breinig, S. et al., *J. Bacteriol.*, 182, 5849-5863, 2000) e

(Leuthner, B., et al., *J. Bacteriol.*, 182, 272-277, 2000) e a *Thauera chlorobenzoica* degrada o fluoro-, cloro-, e bromobenzoato em condições aeróbias e desnitrificantes (Song, B. et al., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51, 589-602, 2001). Apesar os componentes aromáticos simples do petróleo possam
5 sustentar o crescimento das espécies *Thauera*, o seu crescimento na presença de petróleo bruto não havia sido documentado. A *Shewanella putrefaciens* reduz de forma anaeróbia os metais oxidados, tais como ferro e manganês. (Nealson, KH, et al., *Ann. Rev. Microbiol.*, 48, 311-343, 1994) e também pode utilizar uma variedade de redutores, incluindo o nitrato e nitrito (Nealson, KH, et
10 al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 1551-1554, 1995). Embora a *Shewanella* tenha sido relatada como estando associada às amostras do reservatório de petróleo, não foi demonstrado previamente que ela cresce nos componentes do petróleo diretamente. Algumas espécies de *Pseudomonas stutzeri*, em condições aeróbias, degradam o tolueno, fenol, xileno, naftaleno e compostos
15 relacionados ao naftaleno (Bertoni, G. M., et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3626-3632, 1998). Uma cepa específica do *P. stutzeri* degrada de forma anaeróbia o naftaleno em condições desnitrificantes (Rockne, K. J., *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 1595-1601, 2000). Portanto, as variantes de *P. stutzeri* podem possuir uma maior probabilidade de ser capaz de crescer nos
20 componentes do petróleo. O microorganismo que degrada a lignina, o *Microbulbifer hydrolyticus*, não havia sido relatado como sendo anaeróbio, nem redutor do nitrato.

O Exemplo 5 apresenta detalhes do crescimento de algumas dessas cepas em diversos componentes do petróleo ou frações. Uma vez que
25 múltiplas cepas poderiam crescer e acumular biomassa utilizando algum componente do petróleo bruto como uma fonte de carbono, estas cepas podem ser utilizadas para acumular biomassa em um reservatório na presença do acceptor de elétrons e dos aditivos do crescimento adequados.

Portanto, os exemplos a seguir apresentam meios para identificar os microorganismos que poderiam ser utilizados para aumentar a recuperação de petróleo em condições economicamente viáveis sem a necessidade de qualquer suplementação de nutrientes, ou a seleção através do enriquecimento a longo prazo.

EXEMPLOS

A presente invenção é ainda definida nos exemplos a seguir. Deve ser entendido que estes exemplos, embora indiquem as realizações preferidas da presente invenção, são dadas apenas como título de ilustração. A partir da discussão acima e dos exemplos descritos a seguir, um técnico no assunto pode conhecer as características essenciais da presente invenção, e sem se afastar de seu espírito e escopo, pode realizar diversas alterações e modificações da presente invenção para adaptá-lo aos vários usos e condições.

COLETA DE AMOSTRAS AMBIENTAIS

As amostras de petróleo/ água foram obtidas a partir dos poços de petróleo no North Slope do Alasca e o seqüenciamento do DNA ribossomal 16S foi utilizado para identificar os organismos procarióticos presentes nesta mistura de petróleo/ água. Depois de examinar os resultados da análise da comunidade de espécies bacterianas nestas amostras, diversas outras espécies semelhantes ou espécies do mesmo gênero, incluindo aquelas associadas aos outros estudos do petróleo, da ATCC (Tabela 1) para incluir nos exemplos a seguir, foram selecionadas. Estas bactérias foram então utilizadas em uma tela para o crescimento anaeróbico, na presença de petróleo. Foi demonstrado que várias espécies crescem no petróleo, conforme determinado pela quantificação da degradação do nitrato por cromatografia de íons (Tabela 3).

A capacidade de crescer em condições desnitrificantes utilizando

os componentes do petróleo como substratos de carbono foi inesperado para várias dessas espécies. Por exemplo, não houve relatos anteriores da capacidade de um *Marinobacterium* em reduzir o nitrato ou crescer anaerobiamente em petróleo bruto. O *Fusibacter* não foi relatado como sendo capaz de desnitrificação ou de utilização do petróleo bruto para o crescimento.

CRESCIMENTO DE MICROORGANISMOS

As técnicas para o crescimento e manutenção das culturas anaeróbias são descritas em *Isolation of Biotechnological Organisms from Nature*, (Labeda, D. P., ed. págs 117 a 140, McGraw-Hill Publishers, 1990). O crescimento anaeróbico é medido através da degradação do nitrato do meio de crescimento ao longo do tempo. O nitrato é utilizado como aceptor de elétron primário, nas condições de crescimento utilizadas na presente invenção. A redução do nitrato a nitrogênio foi descrito previamente (Moreno-Vivian, C., et al., *J. Bacteriol.*, 181, 6573-6584, 1999). Em alguns casos, os processos de redução do nitrato levam à acumulação do nitrito que é posteriormente reduzido a nitrogênio. Portanto, o acúmulo de nitrito é também considerado uma evidência do crescimento ativo e metabolismo de microrganismos.

ELETROFORESE EM GEL

Os materiais e métodos adequados para a eletroforese em gel podem ser encontrados em *Current Protocols in Molecular Biology*. Os reagentes foram obtidos, salvo indicação em contrário, pelo Invitrogen (Carlsbad, CA), Biorad (Hercules, CA) ou Pierce Químicos (Rockford, IL).

CROMATOGRAFIA IÔNICA

Para quantificar os íons nitrato e nitrito no meio aquoso, uma unidade de cromatografia ICS2000 (Dionex, Banockburn, IL) foi utilizada. A troca iônica foi realizada em uma coluna de troca aniônica AS15 utilizando um gradiente de hidróxido de potássio. As curvas padrão foram geradas e utilizadas para a calibração das concentrações de nitrato e nitrito.

Reivindicações

1. Método para o uso de uma unidade de transmissão e de recepção sem fio (WTRU), o método sendo **caracterizado** pelo fato de compreender:

- gerar um fluxo de bits para a transmissão, o fluxo de bits incluindo bits de dados, e bits campo por carona de reconhecimento / não reconhecimento (PAN);
- intercalar o fluxo de bits para criar um fluxo de bits intercalado;
- modular o fluxo de bits intercalado para criar diversos símbolos, cada símbolo representando diversos bits e tendo ao menos uma posição para o bit menos significativo (LSB), onde nenhum bit PAN se encontra é presente, na porção LSB de cada um dos diversos símbolos; e
- transmitir os diversos símbolos.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a modulação do fluxo de bits é executada por meio de modulação chaveamento de deslocamento de fase oito (8PSK).

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a modulação do fluxo de bits é executada por meio de modulação de amplitude de quadratura 16.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a modulação do fluxo de bits é executada por meio de modulação de amplitude de quadratura 32 (32-QAM).

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que os bits PAN são localizados próximos à sequência de treino.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o resultado do intercalamento e da modulação resulta em bits PAN representando um bit mais significativo de um símbolo.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de ainda compreender:

- aplicar um valor de desvio da potência para a potência de transmissão associada a cada bit do fluxo de bits.

8. Unidade de transmissão e de recepção sem fio (WTRU) para transmitir um bloco de rádio compreendendo bits campo por carona de reconhecimento / não reconhecimento (PAN), a WTRU sendo **caracterizada** pelo fato de compreender:

- um processador configurado para gerar um fluxo de bits para transmissão, o fluxo de bits inclui bits de dados e bits PAN;
- um intercalador configurado para intercalar o fluxo de bits para criar um fluxo de bits intercalado;
- um modulador configurado para modular o fluxo de bits intercalado para criar

diversos símbolos, cada símbolo representando diversos bits e tendo a posição de um bit menos significativo (LSB), na qual nenhum bit PAN seja presente na posição LSB, de cada um dos diversos símbolos; e

- um transmissor configurado para transmitir diversos símbolos.

5 9. WTRU, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada** pelo fato de que o modulador é adicionalmente configurado para modular o fluxo de bits usando a modulação por chaveamento de deslocamento de fase oito (8PSK).

10 10. WTRU, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada** pelo fato de que o modulador é adicionalmente configurado para modular o fluxo de bits usando a modulação de amplitude de quadratura 16.

11. WTRU, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada** pelo fato de que o modulador é adicionalmente configurado para modular o fluxo de bits usando a modulação de amplitude de quadratura 32.

15 12. WTRU, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada** pelo fato de que os bits PAN são localizados próximos à sequência de treinamento.

13. WTRU, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada** pelo fato de que os bits PAN são presentes na posição de um bit mais significativo de um símbolo.

20 14. WTRU, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada** pelo fato de que o transmissor é configurado para aplicar um valor de desvio de potência para a potência de uma transmissão, associada com cada bit do fluxo de bits.

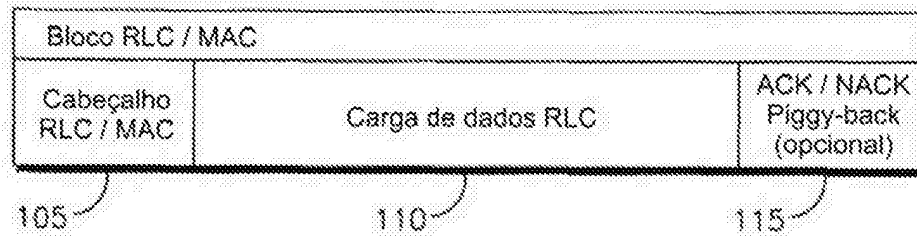


Figura 1

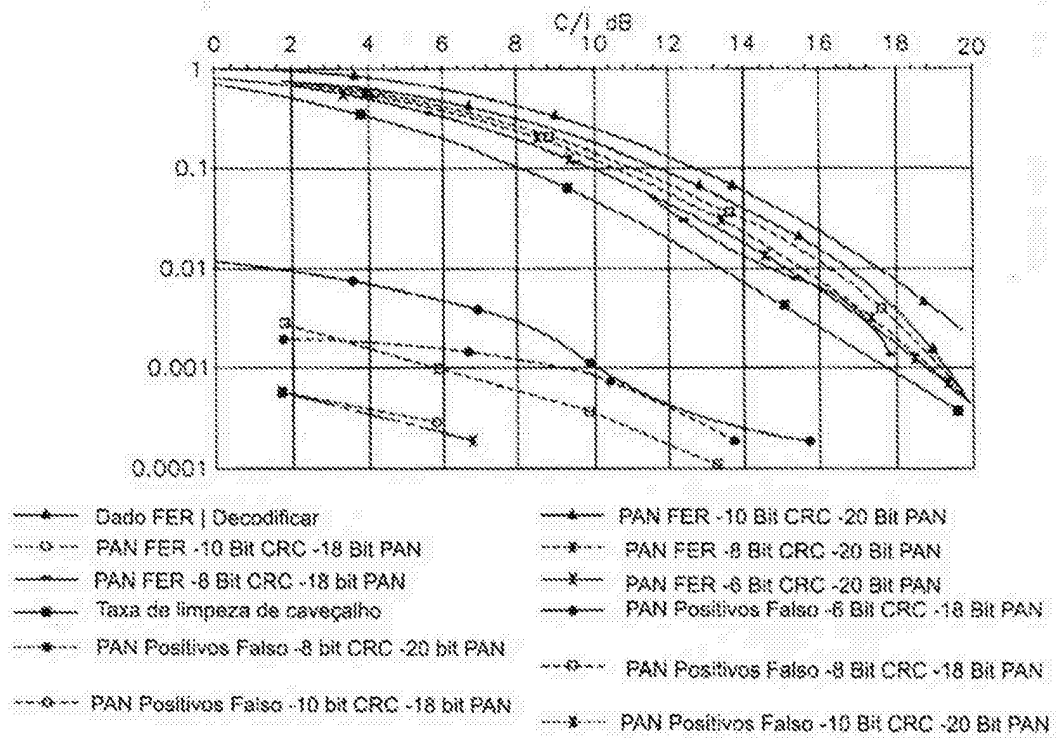


Figura 2

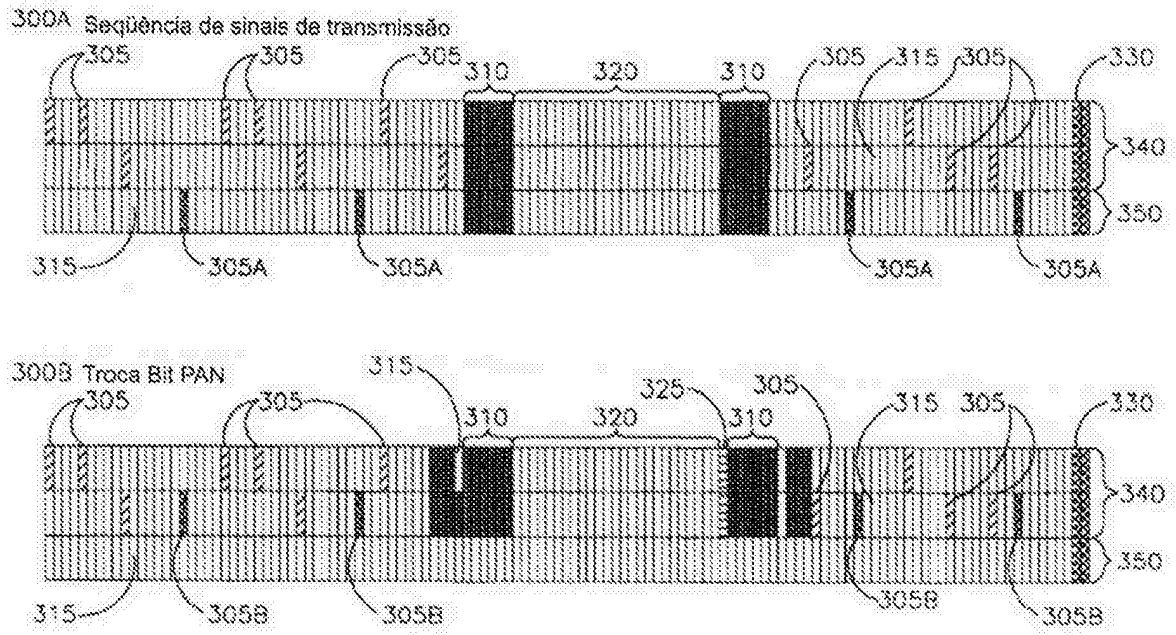


Figura 3

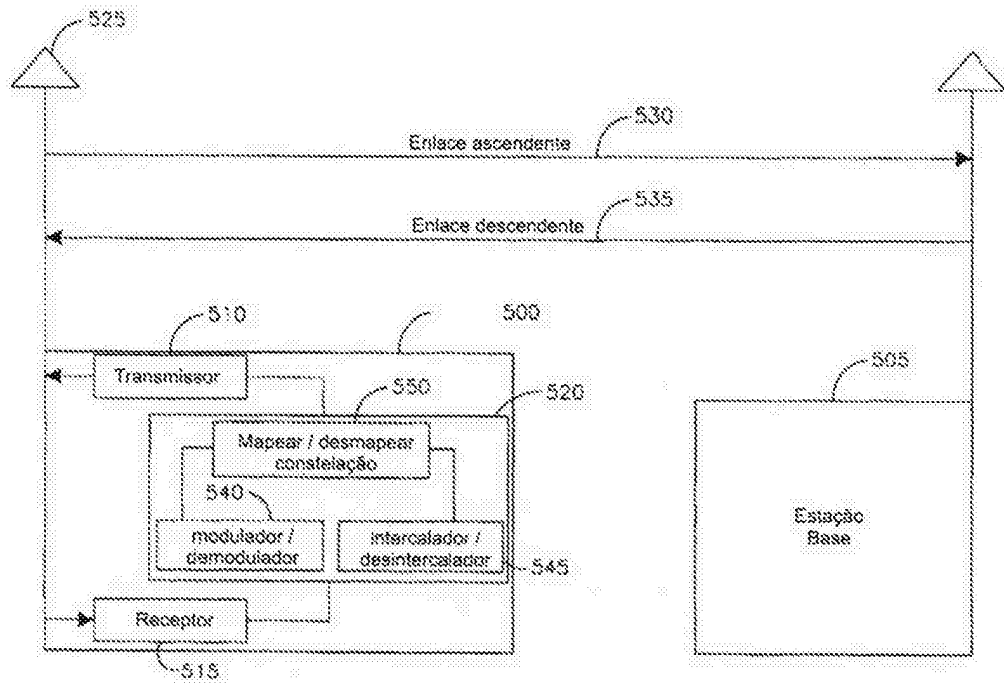


Figura 5

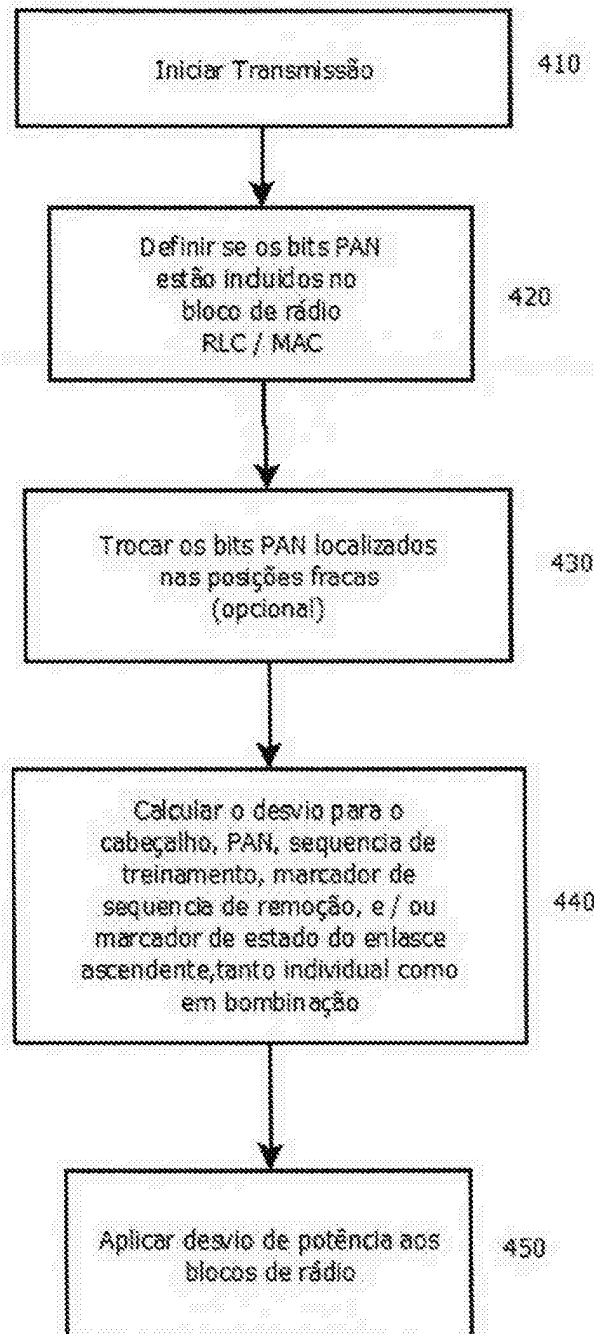


Figura 4

Resumo

Método e dispositivo para transmitir de forma confiável, blocos de rádio aproveitando-se dos campos ACK / NACK.

Os bits por carona de reconhecimento / não reconhecimento (PAN - Piggybacked acknowledgement / non acknowledgement) é uma posição de bits não confiável de onde os símbolos de modulação e de demodulação são trocados com os bits que possuem uma localização em posições mais confiáveis. Em adição, um desvio no ajuste da potência pode ser aplicado aos símbolos que contêm os bits PAN.